

Les marqueurs génétiques en biologie des populations : vers une écologie moléculaire

Michel Raymond

L'ADN a progressivement envahi le champ de la biologie des populations. Pour étudier les conditions de mise en place d'une société d'insectes, pour comprendre la persistance d'un caractère non adaptatif chez une mésange, ou pour démontrer qu'un gène de résistance aux insecticides, chez un moustique, a envahi la planète en trente ans, le chercheur d'aujourd'hui doit maîtriser de nouveaux outils moléculaires qui n'étaient pas disponibles, il y a seulement dix ans. Ces nouveaux outils ne sont pas un but en soi : ils représentent une facette technique qui permet d'explorer des questions qui restaient sans réponse auparavant. Mais, ainsi qu'il est souvent observé dans de telles situations, ils ont aussi permis de formaliser de nouveaux concepts et d'engendrer de nouvelles problématiques.

Les nouveaux outils moléculaires en biologie des populations

Au niveau du génome, on distingue deux catégories de marqueurs génétiques, selon que l'on s'adresse à un locus particulier ou à plusieurs locus à la fois. Dans la première catégorie, se trouvent les microsatellites, les minisa-

tellites, le RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) et le séquençage. Dans la deuxième catégorie, on trouve le *fingerprinting* et les RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). Bien qu'il existe de nombreuses variantes, nous traiterons ici plus particulièrement de ces marqueurs moléculaires et démontrerons leur intérêt en biologie des populations.

Les micro- et minisatellites

Les microsatellites sont constitués d'un ou de quelques nucléotides répétés un petit nombre de fois (la séquence $(AT)_{11}$ ou $(AGT)_8$, par exemple), alors que les minisatellites sont constitués de séquences dont le motif de répétition est plus grand, de l'ordre de plusieurs dizaines à quelques centaines de paires de bases. Généralement, il existe une forte variabilité du nombre de répétitions à un locus donné, qui correspond à un taux de mutation relativement élevé, dû à des erreurs de réplication (« glissement de la polymérase ») ou à des *crossing-over* inégaux. Cela permet de disposer d'un grand nombre d'allèles par locus micro- ou minisatellite.

Les RFLP et le séquençage

Ces techniques, classiques en biologie moléculaire, s'appliquent en biologie des populations lorsque de nombreux individus peuvent être analysés. C'est la variation du profil de clivage par les enzymes de restriction d'une région de l'ADN, ou la variabilité de sa séquence, qui constitue l'information qui va être exploitée. Différentes régions du génome peuvent être ana-

lysées en fonction du problème posé, ces régions pouvant avoir, en particulier, des taux d'évolution différents et/ou des hérédités différentes : hérédité maternelle, comme les mitochondries de la plupart des animaux, ou paternelle comme le chromosome Y des mammifères.

Le *fingerprint* et les RAPD

Réaliser des RFLP en utilisant une sonde minisatellite permet de révéler de nombreuses bandes qui correspondent à un grand nombre de locus. On obtient une « empreinte » (*fingerprint*) qui est unique pour chaque individu. De même, l'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) de l'ADN d'un individu, en employant une amorce aléatoire (RAPD), produit plusieurs bandes qui décrivent également une « empreinte ». Chaque bande d'un individu devant se retrouver chez la mère ou le père, cette technique peut être utile pour exclure aisément des paternités. Dans le cas d'organismes haploïdes (ou diploïdes mais fortement consanguins), chaque bande correspond à un locus, et des applications en génétique des populations sont alors facilitées.

Quelques exemples d'applications

Il n'est pas possible d'énumérer en détail les multiples applications et les nombreuses découvertes pour lesquelles ces nouveaux outils ont joué un rôle prépondérant. Des ouvrages complets leur sont consacrés [1, 2]. Certaines avancées conceptuelles qui ont été possibles seront illustrées ici par quatre exemples très différents.

Michel Raymond

Directeur de recherche au CNRS

Laboratoire de Génétique et Environnement, case courrier 065, UMR CNRS 5554, Université de Montpellier II, 34095 Montpellier, France.

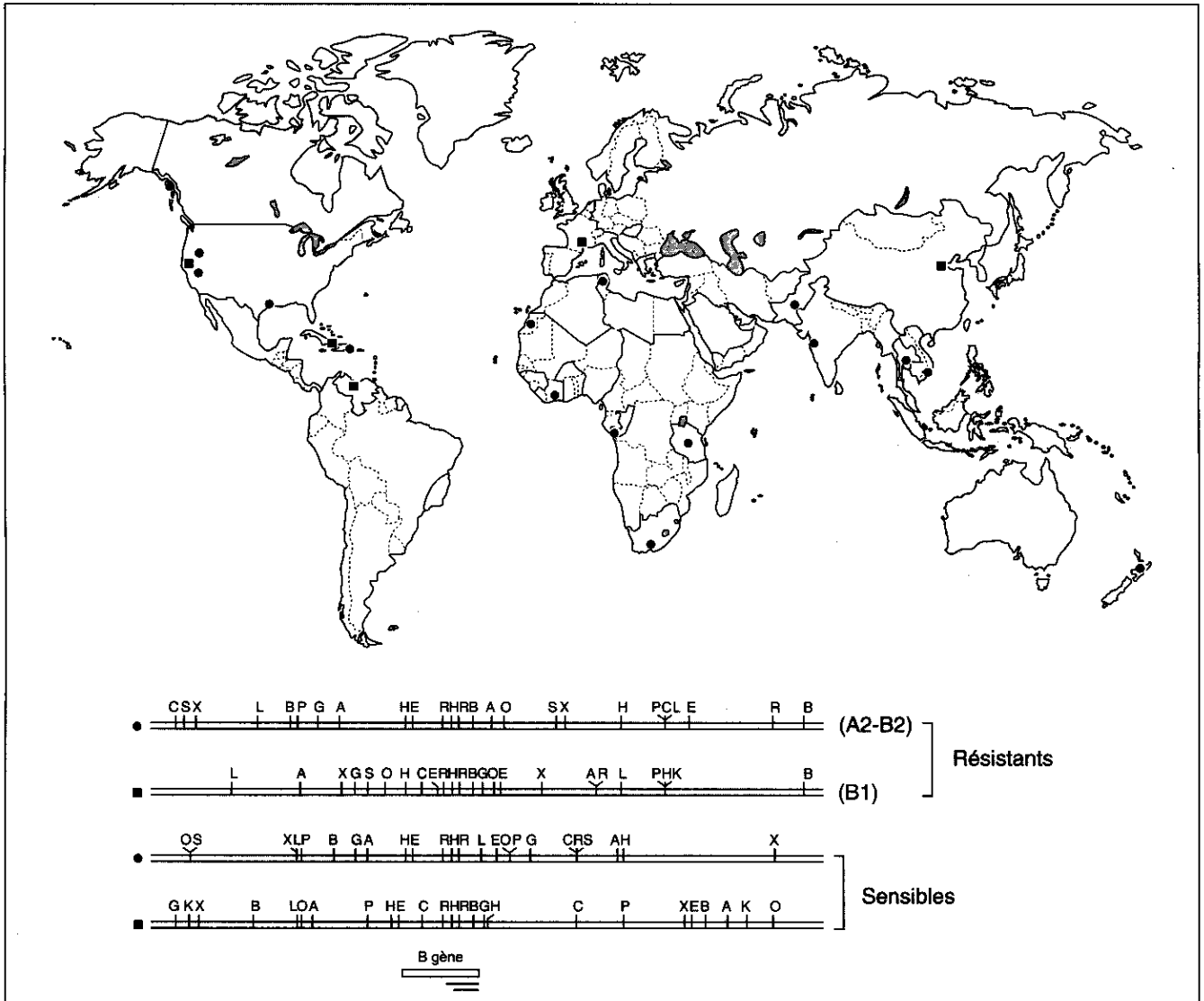


Figure 1. **Invasion mondiale des gènes de résistance aux insecticides.** L'analyse RFLP de la région d'ADN autour du gène de résistance de l'estérase B montre une grande variabilité intra- et interpopulations lorsque des moustiques sensibles, dans des populations non traitées, sont analysés (aucune des cartes de restriction issues d'un individu sensible n'a été retrouvée dans une autre population; deux exemples de telles cartes sont représentés en rouge). Lorsque cette région d'ADN est amplifiée (et procure donc un avantage aux moustiques dans les zones géographiques traitées par les insecticides), le même haplotype se retrouve en fortes fréquences (la variabilité intrapopulations est devenue très faible) et sur de larges étendues géographiques (haplotype A2-B2, ronds rouges, et haplotype B1, carrés rouges), indiquant une origine unique de chaque amplification, suivie d'une migration qui s'est faite en moins d'une trentaine d'années. Les zones géographiques étudiées pour la présence éventuelle de gènes de résistance sont en grisé. Pour les cartes de restriction, chaque lettre indique une enzyme de restriction différente (d'après [8, 25]).

L'origine unique de certaines mutations

Une mutation avantageuse se répand dès qu'elle apparaît, et entraîne avec elle la région du génome qui l'entoure. Si ce scénario se repète de

façon indépendante dans une zone géographique différente, les régions d'ADN entourant la deuxième mutation auront peu de chances d'être les mêmes que précédemment, particulièrement dans le cas où ces régions

sont variables dans les populations naturelles. Ainsi, l'analyse du polymorphisme autour d'un gène sélectionné permet d'établir le nombre de mutations apparues indépendamment, et de suivre la progression géo-

graphique, par migration, d'une mutation particulièrement avantageuse.

Plus de 400 mutations responsables de la mucoviscidose sont connues, mais l'une d'entre elles ($\Delta F508$) est particulièrement fréquente et représente 70 % des cas étudiés. L'analyse du polymorphisme de trois microsatellites proches de la mutation a permis de montrer qu'elle est apparue il y a au moins 52 000 ans, et un mode de migration en plusieurs vagues d'expansion a été proposé [3]. L'origine unique de cette mutation, suivie d'une migration mondiale, suggère qu'elle est sélectionnée probablement à l'état hétérozygote (*m/s n° 5*, vol. 10, p. 599). La même situation se rencontre pour d'autres maladies génétiques [4, 5].

L'avantage que procure un gène de résistance aux insecticides est, en revanche, bien établi et, dès leur apparition, ces gènes peuvent se répandre assez rapidement dans les régions traitées par les insecticides. Cependant, l'apparition d'une résistance dans une population donnée peut aussi correspondre à l'apparition indépendante de la même mutation, et non pas nécessairement à une migration. Cela est d'autant plus probable que l'on sait, par exemple,

que la résistance aux cyclodiènes chez différents ordres d'insectes est due à la même substitution nucléotidique [6], ce qui ne peut s'expliquer que par des événements indépendants. L'étude du polymorphisme autour du gène de résistance, par RFLP ou par séquençage, a permis de montrer, dans la plupart des cas, une origine unique du gène de résistance [7-9] et, par conséquent, la transmission d'un gène mutant, sur une échelle mondiale et en quelques dizaines d'années seulement (*figure 1*).

La parenté et l'évolution de la socialité

Le développement de marqueurs moléculaires a permis de mesurer plusieurs paramètres importants chez les insectes sociaux comme, par exemple, le degré de parenté des ouvrières, le nombre de mâles ayant fécondé une reine d'abeille (*figure 2*), ou le nombre de reines participant à la reproduction [10, 11]. Ces paramètres permettent de tester les théories sur l'évolution de la socialité chez les animaux [12, 13], et de proposer des scénarios d'évolution des castes stériles [14].

Phylogénie et reconstruction des événements évolutifs

Les différents fragments d'ADN, suivant leur nature (séquences codantes/non codantes, intron/exon, etc.), ont des vitesses d'évolution différentes. En séquençant des ADN soigneusement choisis, il est possible de reconstruire des phylogénies plus ou moins « profondes », comme cela a été fait pour certaines espèces ayant divergé lors des dernières glaciations, ou pour les grands groupes de métazoaires (chordés, mollusques, arthropodes, nématodes, etc.) qui se sont différenciés avant le début de l'ère primaire [15]. Ces phylogénies ont de nombreuses applications en biologie évolutive. Par exemple, la comparaison des phylogénies d'un groupe de parasites et de leurs hôtes renseigne sur la spécificité parasitaire sur une grande échelle de temps [16], et permet de détecter des transferts latéraux, comme l'acquisition récente, par les hominidés, de certains schistosomes de bovins ou de rongeurs [17], ou l'infection de différents arthropodes par une bactérie endocellulaire qui modifie leur sexualité [18] (*figure 3*). Il n'est pas possible d'énumérer toutes les utilisations des phylogénies mais, d'une façon générale, elles permettent d'établir les modes d'évolution et de mieux comprendre les mécanismes évolutifs.

Les conflits entre les sexes

La reproduction et les activités comportementales qui lui sont associées sont des occupations centrales des espèces sexuées. Les intérêts reproducteurs des mâles et des femelles ne coïncident pas toujours, ce qui engendre un certain nombre de « conflits » entre les sexes. Les nouveaux marqueurs génétiques ont grandement facilité leur étude. Ainsi, les *fingerprints* servent à détecter les cas de « fausses paternités » ; chez le bruant des roseaux, cette approche a permis d'établir une relation entre une « fausse paternité » et l'investissement paternel dans l'élevage des petits [19] ; chez l'hirondelle des fenêtres ou la mésange bleue, elle a permis de comparer le statut social

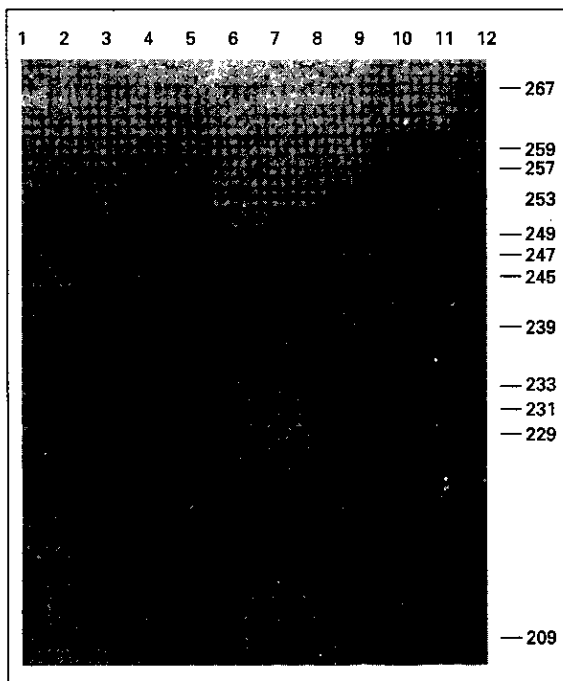


Figure 2. Combien de bourdons ont fécondé la reine d'une ruche ? Douze ouvrières d'abeille d'une même ruche (1 à 12) présentent un allèle paternel différent à un locus microsatellite (le génotype de la reine est 253/247), ce qui indique qu'au moins 12 bourdons ont fécondé la reine [11]. Par exemple, les ouvrières 1, 2 et 3 présentent, respectivement, l'allèle paternel 209, 229 et 233. Le grand nombre de lignées paternelles, chez les ouvrières d'une ruche, diminue l'apparentement génétique entre ces dernières, ce qui a pour conséquence d'augmenter les conflits entre ouvrières.

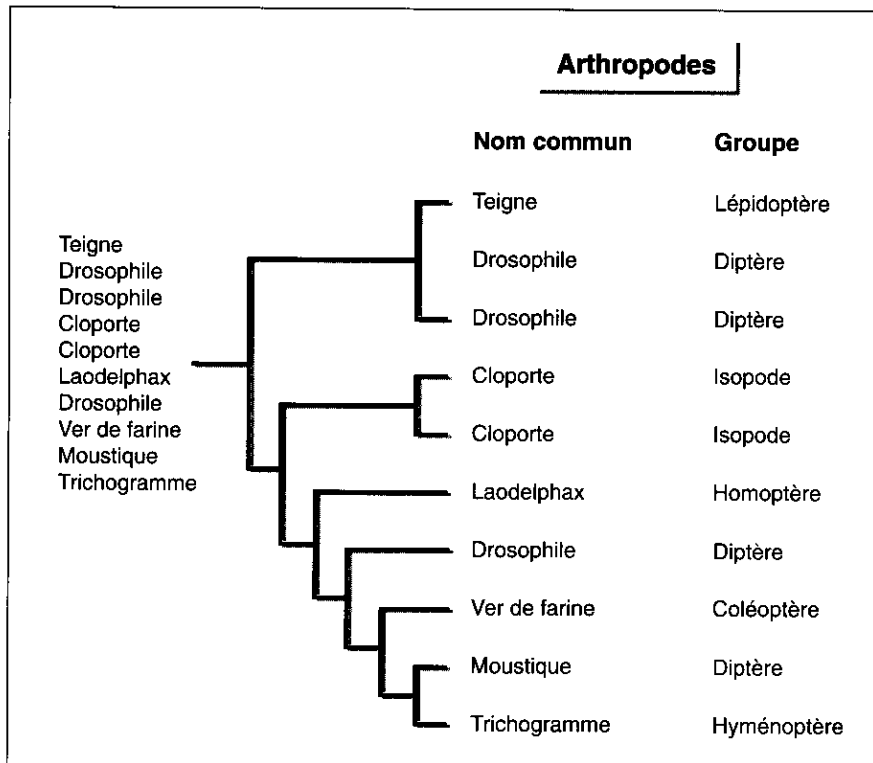


Figure 3. **Phylogénie moléculaire d'une bactérie endocellulaire Wolbachia issue de différents groupes d'arthropodes.** Wolbachia est une bactérie endocellulaire présente chez de nombreux arthropodes (dont environ 10 % des espèces d'insectes), et qui induit de la parthénogenèse, des distorsions de sex-ratio ou des incompatibilités cytoplasmiques. Les séquences de l'ARN ribosomique 16S ou 23S de cette bactérie analysée chez de nombreux arthropodes (des isopodes et différents ordres d'insectes) permettent de construire une phylogénie, qui n'est pas congruente à celle des hôtes qui les hébergent; par exemple, les Diptères, Hyménoptères et Lépidoptères (en rouge) forment un groupe monophylétique qui n'inclut pas les autres groupes (en noir) analysés dans cette étude. De plus, la divergence des hôtes est bien plus ancienne (en centaine de millions d'années) que l'ancêtre commun des bactéries analysées. Cela indique une transmission horizontale fréquente de cette bactérie entre différents groupes d'arthropodes (d'après [18]).

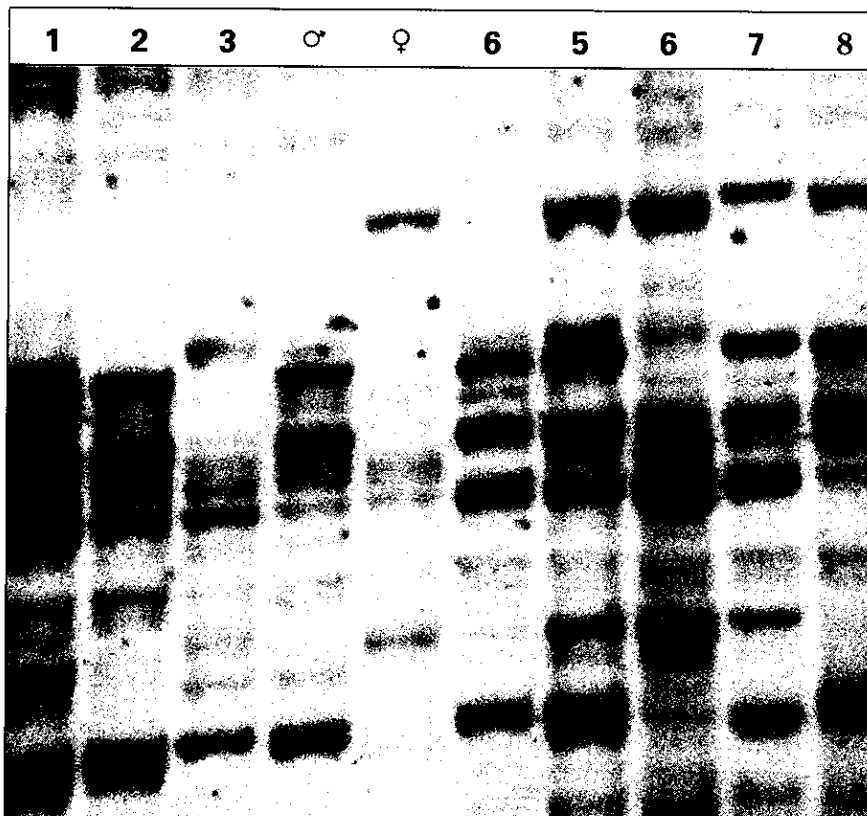


Figure 4. **Système de reproduction d'un mollusque hermaphrodite.** Le système de reproduction d'un mollusque hermaphrodite (*Bulinus globosus*, hôte intermédiaire du parasite responsable de la bilharziose humaine) est étudié en réalisant un fingerprint avec l'ADN total des parents et de leurs descendants [24]. Les descendants issus d'autofécondation partagent un grand nombre de bandes avec leur mère, les descendants issus de reproduction croisée possédant plusieurs bandes propres au père. Les huit descendants analysés ici (puits 1 à 8) sont issus de reproduction croisée entre les deux parents analysés au centre (d'après [24]).

du « père » et du « géniteur » [20, 21], et chez l'homme, la fréquence des « fausses paternités » a pu être évaluée [22]. De nombreuses autres applications des *fingerprints* ou des microsatellites ont été décrites: la détection des œufs « parasites » pondus dans le nid d'une congénère par une femelle qui cherche, par ce moyen, à avoir plus de descendants, sans avoir à les élever [23]; l'établissement de l'ordre de précedence spermatique pour les chances de fécondation; le pourcentage d'auto-fécondation chez les animaux ou plantes hermaphrodites [24] (figure 4).

La détection de ces événements, difficilement mesurables par d'autres approches, permet aujourd'hui de comprendre comment mâles et femelles optimisent leur propre reproduction et comment évoluent les conflits qui résultent de certains intérêts contradictoires. Ce vaste champ d'écologie comportementale basée sur des outils moléculaires est actuellement en pleine expansion ■

RÉFÉRENCES

- Berry RJ, Crawford TJ, Hewitt GM. *Genes in ecology*. Oxford: Blackwell, 1991.
- Avise JC. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York: Chapman and Hall, 1994.
- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, et al. The origin of the major cystic fibrosis mutation ($\Delta F508$) in European populations. *Nature Genet* 1994; 7: 169-75.
- Flint J, Harding RM, Clegg JB, Boyce AJ. Why are some genetic diseases common? Distinguishing selection from other processes by molecular analysis of globin gene variants. *Hum Genet* 1993; 91: 91-117.
- Rotter JL, Diamond JM. What maintains the frequencies of human genetic diseases? *Nature* 1987; 329: 289-90.
- Thompson M, Steichen JC, Ffrench-Constant RH. Conservation of cyclodiene insecticide resistance-associated mutations in insects. *Insect Mol Biol* 1993; 2: 149-54.
- Ffrench-Constant RH. The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 1994; 24: 335-45.
- Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N. Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 1991; 350: 151-3.
- Guillemaud T, Rooker S, Pasteur N, Raymond M. Testing the unique amplification event and the worldwide migration hypothesis of insecticide resistance genes with sequence data. *Heredity* 1996 (sous presse).
- Choudhary M, Strassmann JE, Solis CR, Queller DC. Microsatellite variation in a social insect. *Biochem Genet* 1993; 31: 87-96.
- Estoup A, Solignac M, Cornuet JM. Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proc R Soc Lond B* 1994; 258: 1-7.
- Axelrod R, Hamilton WD. The evolution of cooperation. *Science* 1981; 211: 1390-6.
- Hamilton WD. Kinship, recognition, disease, and intelligence: constraint of social evolution. In: Itô Y, Brown JL, Kikawa J, eds. *Animals societies: theories and facts*. Tokyo: Japan Scientific Society Press, 1987: 81-101.
- Itô Y. A new epoch in joint studies of social evolution: molecular and behavioural ecology of aphid soldiers. *Trends Ecol Evol* 1994; 9: 363-5.
- Adoutte A, Philippe H. The major lines of metazoan evolution: summary of traditional evidence and lessons from ribosomal RNA sequence analysis. In: Pichon Y, eds. *Comparative molecular neurobiology*. Basel: Birkhäuser Verlag, 1993: 1-30.
- Combes C. *Interactions durables. Écologie et évolution du parasitisme*. Paris: Masson, 1995.
- Desprès L, Imbert-Establet D, Combes C, Bonhomme F. Molecular evidence linking Hominid evolution to recent radiation of schistosomes (*Platyhelminthes: Trematoda*). *Mol Phyl Evol* 1992; 1: 295-304.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M. *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc R Soc Lond B* 1992; 250: 91-8.
- Dixon A, Ross D, O'Malley SLC, Burke T. Paternal investment inversely related to degree of extra-pair paternity in the reed bunting. *Nature* 1994; 371: 698-700.
- Møller AP. *Sexual selection and the barn swallow*. Oxford: Oxford University Press, 1994.
- Kempnaers B, Verheyen GR, Van den Broeck M, Burke T, Van Broeckhoven C, Dhondt AA. Extra-pair paternity results from female preference for high-quality males in the blue tit. *Nature* 1992; 357: 494-6.
- Le Roux MG, Pascal O, André MT, Herbert O, Moisan JP. Non-paternity and genetic counselling. *Lancet* 1992; 340: 607.
- Gelter HP, Tegelström H. High frequency of extra-pair paternity in Swedish pied flycatchers revealed by allozyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *Behav Ecol Sociobiol* 1992; 31: 1-7.
- Jarne P, Delay B, Bellec C, Roizes G, Cuny G. Analysis of mating systems in the schistosome-vector hermaphrodite snail *Bulinus globosus* by DNA fingerprint. *Heredity* 1992; 68: 141-6.
- Qiao CL, Raymond M. The same esterase B1 haplotype is amplified in insecticide resistant mosquitoes of the *Culex pipiens* complex from the Americas and China. *Heredity* 1995; 74: 339-45.

TIRÉS À PART

M. Raymond.